

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
MOLEKULAAR-JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
Tehnoloogiasinstituut

Mirjam Tamme

**REPORTERGEENI KOESPETSIIFILISE EKSPRESSIOONIGA PLASMIIDI
KONSTRUEERIMINE**

Bakalaureusetöö

Juhendajad PhD. Liis Andresen

PhD. Kaido Kurrikoff

Tartu 2015

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID	3
SISSEJUHATUS.....	4
1.KIRJANDUSE ÜLEVAADE	5
1.1 Geeniteraapia	5
1.2 Transfektsioon	6
1.3 Rakku sisenevad peptiidid	7
1.3.1 RSPde klassifikatsioon.....	8
1.4 Geeniekspressioonivektorid.....	9
1.5 Reportergeenid.....	11
1.5.1 Lutsiferaas	11
1.6 Närvisüsteemi kasvajak	12
1.6.1 Neuroblastoom.....	12
1.7 Sekreetograanin 3 (SGC3).....	13
2.EKSPERIMENTAALNE OSA.....	14
2.1 Töö eesmärk	14
2.2 Materjalid ja meetodika.....	14
2.2.1 Plasmidi disain.....	14
2.2.2 Plasmidi süntees ja paljundamine	17
2.2.3 Kasutatud rakuliinid ja nende kasvatamine	19
2.2.4 Plasmidi transfektsioon rakkudesse	19
2.3 Tulemused ja arutelu	20
2.3.1 SCG3-ASH promootor-enhancer.....	20
2.3.2 Lutsiferaasi geen	21
2.3.3 pLIVE vektor	21
2.3.4 Konstrukti kontroll.....	22
2.3.5 Plasmidi testimine <i>in vitro</i> koekultuuri tingimustes	22
3.KOKKUVÕTE.....	25
4.SUMMARY	26
5.KIRJANDUSE LOETELU	27
6.LISAD	31
6.1 LISA 1 Plasmidi pLIVE-ASH-Luc järjestus	31
6.2 Lihtlitsents	35

KASUTATUD LÜHENDID

bp	Aluspaar (<i>basepair</i>)
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium sööde
FBS	Veise looteseerum (<i>Fetal bovine serum</i>)
GFP	Roheline helendav valk (<i>Green Fluorescent Protein</i>)
HIV	Inimese immuunpuudulikkuse viirus (<i>human immunodeficiency virus</i>)
LF2000	Lipofektamiin 2000 (<i>Lipofectamine 2000</i>)
Luc	Lutsiferaas
mQ	Deioniseeritud vesi
pDNA	Plasmiidne DNA
PF	PepFect, transportaan10-l põhinevad modifitseeritud rakku sisenevad peptiidid
PF14	PepFect14
RSP	Rakku sisenevad peptiidid (<i>cell penetrating peptide</i>)
SCG3	Sekretograanin 3 (<i>Secretogranin 3</i>)
TP	Transportaan

SISSEJUHATUS

Meditstiini areng on inimeste jaoks alati väga oluline olnud. Selleks on pidevalt üritatud leida uusi viise, kuidas haigusi efektiivsemalt ravida, erandiks ei ole ka kasvaja. Kuigi meditsiinitehnika on arenemas kiirelt ning loomisel on palju vahendeid, kuidas kirurgiliselt kõige paremini kasvaja eemaldada, siis siia maani tundub, et kõige tõhusamaks viisiks selles valdkonnas on geeniteraapia. Antud protsessi puhul on võimalik vigane geen asendada toimiva geeniga või modifitseerida geeni ekspressiooni määra. Juhul kui protsess toimub veatult, on väga lihtne kasvajakudesse olevaid protsesse juhtida soovitud suundades ning sundida kasvaja taanduma. Täna see veel nii lihtne ei ole, sest geneetilisel materjalil on keeruline rakku siseneda just selle fosfolipiidsse kaksikkihi tõttu. Teadlased on välja pakkunud mitmeid erinevaid lahendusi, millest enim kasutatavamad on transportvektorid. Palju on kasutusel viiruslike transportvektoreid, kuid viimasel ajal on populaarseimaks osutunud mitteviiruslikud, just põhjusel, et nad ei tekita immuunvastust.

Bakalaureusetöö eesmärk on konstrueerida plasmiidne reportersüsteem, mis ekspresseerib reportergeeni (Luc2) koospetsiifiliselt ning testida selle potentsiaalset kasutusvõimalust närvikoe-spetsiifiliselt geeni ekspresseerimiseks.

Eesmärgi saavutamiseks on vaja lahendada alljärgnevad ülesanded:

1. Planeerida plasmidi kloneerimise etapid
2. Teostada kloneerimine, mis lõpeb soovitud plasmidi saamisega ja sisaldab närvikoe-spetsiifilist promootor-enhancer kasseti ning Lutsiferaasi geeni
3. Testida plasmidi efektiivsust *in vitro*, transfecteerides plasmidi nii neuraalsetesse kui mitteneuraalsetesse rakkudesse, kasutades PF14 abi.

Bakalaureusetöö on valminud Tartu Ülikooli Molekulaar- ja Rakubioloogia Instituudi bioloogia õppekava raames, eksperimentaalne osa on läbi viidud Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudis. Sooviksin siinkohal tänada juhendajaid Liis Andreseni ja Kaido Kurrikoffi, kes aitasid nii töö planeerimisel kui ka läbi viimisel. Samuti tänusõnad Kadi-Liis Veimanile, kes oli abiks eksperimentide läbi viimisel.

Märksõnad: Neuroblastoom, transfectsioonivektor, geeniekspressioonivektor, kasvaja

1.KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Geeniteraapia

Geeniteraapia on DNA kasutamine haiguste raviks läbi DNA molekulide transpordi patsiendi rakkudesse, kus nad kas ekspresseeruvad valkudena, segunevad teiste valkude ekspressiooniga või parandavad geneetilisi mutatsioone. Samuti võib meetodis kasutada ka siRNA molekule või muid oligonukleotide, mis mõjutavad olemasoleva geeni ekspressioonimäära. Geeniteraapiat on haiguste ravimiseks kasutatud juba viimased 20 aastat. Sellel protsessil on olnud nii häid kui ka halbu aegu. Nüüdseks on leitud lahendused paljudele varem ette tulnud raskustele ning turul on esimene kommertsiaalne geeniteraapia produkt Glybera, mida kasutatakse lipoproteiin lipaasi puudulikkuse raviks (Ylä-Herttuala S, 2012).

Geeniteraapia sisaldab siiski ka tänapäeval veel palju küsimusi ning on seeläbi üks suurimaid tehnilisi väljakutseid kaasaegses meditsiinis. Seda just seetõttu, et on keeruline sisestada uusi genee keharakkudesse ning hiljem neid ka töös hoida. Probleemidena kerkivad esile immuunvastus, sest meie keha immuunsüsteem võitleb aktiivselt sissetungijate vastu nagu bakterid ja viirused. Seetõttu peavad geeniteraapia käigus sisestatud molekulid olema võimelised vältima keha kaitsesüsteeme, kuna ebavajalik immuunvastus võib lõppeda raske haiguse või isegi surmaga.

Teine oluline probleem on ülejäänud oluliste geenide töö segamine sihtmärk-rakus. Geeniteraapiat võib pidada õnnestunuks kui sisestatud geen töötab patsiendi rakus kogu tema ülejäänud elu. Selleks peab geen täielikult integreeruma raku genoomi, kui sellisel juhul säilib võimalus, et geen integreerub rakus valesse kohta ning segab mõne teise olulise geeni tööd.

Samuti takistab geeniteraapia laialdast levikut asjaolu, et enamus lähenemisi selles valdkonnas on patsiendi ja haiguse spetsiifilised, näiteks võib ette tulla situatsioone kus patsiendi rakk eemaldatakse temast, modifitseeritakse terapeutilise geeniga ning seejärel tagastatakse rakk patsiendi kehasse. Seega geeniteraapia toomine kõigi abivajajateni on hetkel oluline küsimus (University of Utah, 2015).

Aga just geenide turvaline ja efektiivne transport rakku on teadlaste jaoks osutunud kõige suuremaks proovikiviks, sest geneetilise materjali sisenemisel rakkudesse võib esineda

erinevaid raskusi. Selle üheks põhjuseks on näiteks rakku ümbritsev fosfolipiidne kaksikkiht, mis takistab suurte biomolekulide difusiooni raku sisekeskkonda (Wang *et al.*, 2013).

1.2 Transfektsioon

Viimasel ajal on arendatud palju erinevaid transfektsiooni meetodeid ehk viise kuidas võõr-DNA-d rakku sisestada, et leida lahendus geenide turvalisele ja efektiivsele transpordile rakkudesse. Transfektsiooni sooritamise viise saab suuremal skaalal jagada neljaks: keemiline, füüsikaline, bioloogiline ja viiruslik.

Viirusliku transfektsiooni korral kasutatakse DNA transportimisel rakku viiruseid kandjatena. Üldiselt kasutatakse sellisel juhul adenoviiruseid, sest nad transfecteeruvad väga paljudesse inimese rakkudesse ning neil on kõrge transfektsiooni tase võrreldes teiste saadaolevate vektoritega, samuti on nad võimelised kandma suuri DNA segmente (kuni 7,5 kbp) ning neid on lihtne manipuleerida kasutades rekombinantse DNA tehnikaid. Teine oluline klass viraalseid vektoreid, mida kasutatakse, on retroviirused. Siiski esineb viiruslike vektorite kasutamisega ka probleeme, sest nad võivad esile kutsuda keha immuunvastuse ning nende kasutamine on kallis ja vajab vastavat väljaõpet (Vorbürger *et al.*, 2002).

Mitteviiruslike transfektsiooni meetodite alla kuuluvad keemiline, füüsikaline ning katioonsete lipiidide kasutamine molekuli transpordiks rakku. Keemiliseks meetodiks loetakse näiteks DNA töötlemist kaltsium kloriidiga (Graham *et al.*, 1973), mis katalüüsib DNA transporti rakkudesse fosfaatide abil. Kuigi *in vitro* sobib ta küll suure hulga rakkude kiireks transfektsiooniks, siis loetakse ta efektiivsust siiski madalaks ning *in vivo* transfektsiooniks kaltsium kloriidiga töötlemine ei sobi.

Füüsikaliste transfektsiooni meetodite alla kuulub näiteks mikroinjektsioon, kus nukleinhapped sisestatakse rakku peene nõelaga (Cappecchi, 1980). Sellist meetodit on edukalt kasutatud näiteks DNA sisestamisel embrüonaalsetesse tüvirakkudesse eesmärgil produtseerida transgeenseid organisme (Bockamp *et al.*, 2002). Teiseks füüsikalise meetodi näiteks võib tuua elektroporatsiooni, mille käigus kasutatakse elektromagnetilist impulssi, mis rikub rakumembraani ja teeb ta vastuvõtlikumaks nukleinhapetele, mis saavad seeläbi rakku siseneda (Shigekawa *et al.*, 1988).

Katioonsete lipiidide kasutamine kujutab endas lipiidide seondumist negatiivselt laetud DNAGA transportides selle endotsütoosi teel läbi rakumembraani (Parissis *et al.*, 2003; Kaestner *et al.*, 2015). Hetkel on tegu väga palju lubava ning efektiivse süsteemiga, mistõttu on ta ka laialdaselt kasutusel. Seda just võime tõttu transfekterida rakke, mis on resistentsed kaltsium fosfaadile. Samuti on võime transfekterida erineva suurusega DNA molekule ning seda nii *in vivo* kui ka *in vitro*. Rakud mida on transfekteritud kasutades katioonseid liposoomi on võimalik kasutada nii lühiajalise ekspressiooni kui ka pikaajaliste eksperimentide uurimisel. Siiski esineb sellel süsteemil ka mitmeid kõrvalmõjusid. On tõestatud nende liposoomide toksilised kõrvalmõjud ning nende transfekterimise efektiivsus sõltub seerumi komponentide olemasolust. Üheks väga tüüpiliseks katioonseks lipiidiks on *Lipofectamine* (LF) (Wang *et al.*, 2013; Kaestner *et al.*, 2015). LF-ist tulenevalt on loodud ka rakku sisenevaid peptiide (RSP), mis sisenevad rakku sarnaselt liposoomidega, kuid lisaks transpordile läbi rakumembraani suunavad nad ka rakusisest sihtmärgini jõudmist (Mäe *et al.*, 2006; Heitz *et al.*, 2009).

1.3 Rakku sisenevad peptiidid

Rakku sisenevad peptiidid (RSP-d) on üks klass transportvektoreid. Need on lühikesed peptiidid, mis reguleerivad erinevate molekulide rakku sisenemist (alustades väikestest keemilistest molekulidest ja lõpetades suurte DNA fragmentidega) ning seda nii *in vivo* kui ka *in vitro* tingimustes (Milletti, 2012). RSPd on katioonsed ja/või amfipaatset peptiidid, mille pikkus ei ületa üldjuhul 30 aminohapet (Mäe *et al.*, 2009). Esimene RSP avastati teineteisest sõltumatult kahe labori poolt aastal 1988, kui leiti, et HIV-1 aktivaatorit TAT suudavad kasvukultuurist omandada mitmed erinevad raku tüübid (Green *et al.* 1988). Sealt alates on teadaolevate RSPde arv suurenenud tunduvalt ning loodud on veel sarnaseid analooge (Okuyama *et al.*, 2007). Peptiid seob end transporditava molekuliga läbi kovalentse sideme või läbi mitte-kovalentsete ühenduste, pDNA saab RSPga seotud olla vaid läbi mitte kovalentse sideme.

RSPd on üks potentsiaalsetest viisidest, kuidas aineid rakku transportida. Täna hoiab laialdast levikut tagasi ebaselge arusaam RSPde rakku sisenemise mehhanismidest ning RSPde raku spetsiifilisuse puudumine. Kuid mitmed uuringud läbi aastate on hakanud neid mehhanisme selgitama, üheks põhiliseks sisenemiseviisiks peetakse hetkel endotsütoosi

(Milletti, 2012). Eriti oluline on see uute RSPde välja töötamisel ning juba olemas olevate efektiivsemaks muutmisel.

pDNA transporti rakkudesse, mida vahendavad RSPd on täheldatud paljudes eksperimentides, kuid on ka märgatud, et selleks on vaja teatud määral peptiide modifitseerida, sest ilma modifikatsioonideta peptiidid on üldjuhul olnud halvad vektorid (Ignatovich *et al.*, 2003). Selle põhjus võib tuleneda sellest, et enamus RSPsid kondenseerivad pDNA nanopartikkelideks, mis lagunevad väga lihtsalt ning suure tõenäosusega juba enne kui pDNA jõuab rakkudesse. Teise põhjusena nähakse, et kuna RSPd kasutavad endotsütootilisi radu jäävad väga paljud RSPd kinni endotsütootilistesse vesiikulitesse ning ei jõua seetõttu sihtmärgini. Nende probleemide lahendamiseks on siiski aja jooksul loodud erinevalt keemiliselt modifitseeritud RSPsid. Nii on näiteks välja töötatud terve rida modifitseeritud RSPsid, mis kuuluvad PepFect (PF) klassi. Tegu on RSPdega, millele on lisatud stearüül-rühm, mis suurendab nende amfipaatsust ja seetõttu ka transfektsiooniefektiivsust. Tõestatud on selle RSPde klassi võime transportida rakku nii pDNA kui ka siRNA (Ezzat *et al.*, 2011). Üks PF-ide klassi kuuluv peptiid PepFect 14 (PF14, järjestusega stearyl-AGYLLGKLLLOOLAAAALLOOLL-NH₂) on tõestanud võimet transportida rakkudesse pDNA, kondenseerides pDNA negatiivselt laetud nanopartiklaks ning toimetades pDNA erinevatesse raku liinidesse efektiivsemalt kui seda varasemad RSPd on suutnud (Veiman *et al.*, 2012).

1.3.1 RSPde klassifikatsioon

RSPsid võib nende membraaniga seondumise alusel jagada kolme gruppi (Ziegler, 2008)

- 1) Primaarsed amfipaatsed RSPd
- 2) Sekundaarsed amfipaatsed RSPd
- 3) Mitte-amfipaatsed RSPd.

Primaarsed amfipaatsed RSPd

Primaarsed amfipaatsed RSPd on peptiidid, mis sisaldavad üldjuhul üle 20 aminohappe ning amfipaatsus viitab sellele, et molekulil on olemas nii hüdrofiilne ja hüdrofoobne osa. Nende peptiidide primaarstruktuuris esineb amfipaatsus näiteks selles, et esindatud on hüdrofiilne N-terminaalne ots ning peamiselt hüdrofoobne C-terminaalne ots.

Sellesse klassi kuuluvad näiteks Transportaan (TP), mille puhul on tegu kimäärse 27 aminohappest koosneva peptiidiga (Ziegler, 2008). Üks Transportaan-i analooge on ka Pepfect 14.

Sekundaarsed amfipaatsed RSPd

Sekundaarsed amfipaatsed RSPd avaldavad oma amfipaatsed omadused alles peale skundaarstruktuuride teket, kui RSP on seondunud membraani pinnamolekulidega. Seondudes membraanidega omandavad need peptiidid alfa-heeliksi või beeta-lehe konformatsiooni. Üks sekundaarsetest amfipaatsetest RSP-dest on näiteks Penetratin (Ziegler, 2008).

Mitte-amifipaatsed RSPd

Sii klassi kuuluvad RSPd, mis ei oma primaarseid amfipaatsed omadusi ning ei ole võimelised moodustama ka sekundaarseid amfipaatsed struktuure. Mitte-amfipaatsed RSPd on oma loomult väga katioonsed, seetõttu ei seostu nad lipiidmembraanidele ilma kõrge kontsentratsiooni anioonsete lipiidide kohaloluta. Sellesse klassi kuuluvad näiteks inimese immuunpuudulikkuse viiruse (HIV) tüüp 1 transkriptsiooni faktor TAT ja oligoarginiinid. (Ziegler, 2008).

1.4 Geeniekspressioonivektorid

Tänapäeval on geenidega manipuleerimine ning nende tundma õppimine muutunud kergemaks kui kunagi varem. Selleks kasutatakse geeniekspressioonivektoreid, milleks on DNA molekul, mille abil on võimalik kanda geneetilist materjali ühest rakust teise. Tuleb mees pidada, et ka uues rakus peab molekulil olema võimalus replitseeruda ja ekspresseeruda. Kasutusel on nii viraalsed kui ka mitte viraalsed vektorid, näidetena võib välja tuua plasmiidid, kosmiidid ja kunstlikud kromosoomid (Lodish *et al.*, 2000).

Viraalseid vektoreid kasutatakse laialdaselt just nende molekulaarsete mehhanismide tõttu, mis läbi suudavad nad väga efektiivselt transportida enda genoomi nakatatud rakku. Üldiselt loetakse viraalseid vektoreid turvalisteks vähese mõjuga raku füsioloogiale ning stabiilseteks (Goff *et al.* 1988). Kuid on olnud ka juhuseid, kus patsienti raviti adenoviirusel põhineva vektoriga, kuid vektor kutsus patsiendil esile süsteemse põletikulise vastuse sündroomi

(SIRS), millega kaasnes akuutne hingamisteede ahistamise sündroom (ARDS), mis antud juhul lõppes patsiendi surmaga (Hollon, 2000).

Eelnevalt välja toodud põhjuste tõttu kasutatakse populaarsemaks osutunud mitteviraalsetest vektoritest kõige rohkem plasmide. Kõige tihedamalt leidub neid tsirkulaarseid, kaksikheeliksi kujul esinevaid DNA molekule bakterites. Plasmid koosneb harilikult replikatsiooni alguspunktist, antibiootikumide resistentsusgeenist, kloonimissaidist, sisestatud DNAST ning promootor piirkonnast (Freshney, 2010). Kunstlikult toodetud plasmide on molekulaarses kloonimises võimalik laialdaselt kasutada (Thomas *et al.*, 2008). Kloonimiseks on loodud palju erinevaid plasmide, nagu näiteks pUC19, mis on üks laialdasemalt kasutatud plasmide (Yanisch-Perron *et al.*, 1985), teise laialdaselt kasutusel oleva vektorina võib välja tuua pLIVE (Mirusbio, www.mirusbio.com). Plasmidi kasutamise eelised tulenevad sellest, et nendega on lihtne töötada. Nad on disainitud sellisesse suurusesse, et tänapäevaseid kloonimis-tehnikaid kasutades on võimalik uurida huvi pakkuvat geeni laialdasel suuruse vahemikus (1,000-20,000 aluspaari). Nad replitseeruvad iseseisvalt, tänu millele suudavad iseseisvalt bakteris kasvada ning paljuneda. Plasmidid on stabiilsed, seega on neid võimalik pikalt säilitada puhastatud DNA kujul või bakteri sees. Lisaks on nad universaalsed ja neid on võimalik kasutada paljudes liikides huvipakkuva geeni ja selle funktsiooni tudeerimiseks (Freshney, 2010).

Järgmise kloonimis etapina järgneb plasmidi sisestamine bakterisse läbi transformatsiooni, mis kujutab eksogeense DNA sisenemist väliskeskkonnast läbi rakumembraani rakku, kus see liidetakse siis kas raku enda geneetilise materjaliga või hakatakse võõrgeeni ekspresseerima (Alberts, 2002). Sellele järgnevalt asetatakse bakterid kasvukeskkonda, kus leidub kindlaks määratud antibiootikumi ning ainult bakterid, kelle geenomi sisenenud plasmidist, jäävad ellu. Seega antibiootikumid töötavad kui filtrid, valides ainult modifitseeritud bakterid. Sellele järgnevalt saab baktereid juba kasvatada ning hiljem lüüesides isoleerida huvipakkuv plasmid (Boundless, 2015).

1.5 Reportergeenid

Kindlaks määratud geeni ekspresseerumist rakupopulatsioonis või organismis saab hinnata, kui sellega ühendada reportergeen. Reporteriks kasutatakse üldjuhul kindlaid geene, mille omadustest tulenevalt on nende ekspressioon organismides hästi mõõdetav. Tavaliselt kasutatakse reportergeene, millel on visuaalselt kindlaks tehtavad omadused, nagu näiteks fluorestseeruvad või luminessentsi sisaldavad valgud. Kõige enam kasutatakse meduusi rohelist fluorestseeruvat valku (Green Fluorescent protein – GFP), mis põhjustab aktiivse valguekspressiooni korral rohelist helendamist lainepikkuse vahemikus 395 – 475 nm (Tsien, 1998). Teine enim kasutatud ensüüm on lutsiferaas (Luc), mis katalüüsib lutsiferiini substraadina kasutades valgustootmisreaktsiooni (Jachoon *et al.*, 2007).

1.5.1 Lutsiferaas

Lutsiferaaside puhul on tegemist ensüümidega, mida kasutatakse bioluminessentsi saavutamiseks. Looduses on reaktsioon levinud paljudel merelise eluviisiisiga selgrootutel, selgroogsetel, seentel, aga ka mikroorganismidel. Tuntuim näide on jaanimardikas (*Lamyrus noctiluca*). Labori tingimustes kasutatakse kõige tihedamini lutsiferaasi *P.pyralis*'sest, aga ka teistest jaanimardika liikidest on rekombinantsed lutsiferaasid saadaval (Gould SJ *et al.*, 1988).

Lutsiferaasi reaktsioonis vabaneb valgus kui lutsiferaas puutub kokku kas lutsiferiini või koelenterasiiniga. Keemilist reaktsiooni, mida katalüüsib jaanimardika lutsiferaas võib jagada kahte etappi. Esimeses sünteesitakse lutsiferiinist ja ATPst lutsiferüül adenülaat ning pürofosfaat ning teises etapis reageerib lutsiferaas adenülaat hapnikuga, mille tulemusel eralduvad oksülutsiferiin, AMP ja valgus (Fraga *et al.*, 2007). Footonite emissiooni mõõdetakse valgustundliku aparaadiga nagu seda on luminomeeter. Selle masina abil saab erinevaid bioloogilisi protsesse, mis jälgitava geeniga toimuvad, uurida (Fan *et al.*, 2007).

1.6 Närvisüsteemi kasvaja

Kasvaja on harilikult ühe rakutüübi funktsionaalselt kasutu ja ebanormaalse paljunemise tulemusel sündinud rakulis-koeline moodustis. Nad võivad olla kas healoomulised, ehk siis ei kandu edasi teistesse kudedesse ja kehaosadesse või nad võivad olla ka halvaloomulised, mis läbi nakatavad nad ka teisi kudesid. Närvisüsteemi kasvaja arenevad üldjuhul kas pea- või seljaajus. Ajukasvajatel on tavaliselt ettearvamatud tagajärjed ja seda tingituna aju keerukusest ja tema rollist inimese keha funktsioneerimise juures.

Tavaliselt ravitakse ajukasvajaid lõikuse ning radiatsiooniga, kuigi nende protseduuride efektiivsus on üpris limiteeritud, sest püsib kõrge risk, et läbi ravi võidakse kahjustada terveid ajukudesid.

Umbes 44% kõigist ajukasvajatest on healoomulised ning kuigi need kasvaja ei levi on nende ohtlikus siiski tõsine, sest nad võivad naasta peale eemaldamist ning olla siis juba surmavad (Stanley, 2000).

1.6.1 Neuroblastoom

Neuroblastoom on ekstrakraniaalne kasvaja, mis on pärit sümpaatilisest närvisüsteemist. Alguse saab neuroblastoom tavaliselt neerupealiste närvikoes ning kasvaja tekib kaela, rinna ja selja piirkonnas (Portela-Gomes *et al.*, 2010). Tegemist on tuumoriga, mis levib arenevates kudedes. Seda diagnoositakse lapseas keskmiselt vanusega 17 kuud (London *et al.*, 2005). Neuroblastoomi ravi on hetkel veel keeruline protsess, sest sisaldab endas kasvaja kirurgilist eemaldamist, millele järgneb keemiaravi ning tüvirakkude taastamine. Keemiaravi tulemusel paljudel patsientidel kasvaja taandub, kuid 50-60% neist naaseb haigus hiljem uuesti (Maris, 2010). Vaatamata antud kasvaja negatiivsetele mõjudele *in vivo* ning olukorrale, kus ei ole leitud veel sobivaimat ravimit tuumori raviks on selle kasvaja rakuliinid teadlaste töös väga vajalikud töövahendid. Tegu on neuraalplaadilt pärit rakkudega, mis on võimelised lõpmatult *in vitro* paljunema. Neuroblastoomi rakuliinid on võimelised diferentseeruma erinevateks rakutüüpideks vastavalt kasutatavale agendile ning see omadus teeb just need rakuliinid suurepäraseks vahendiks paljude *in vitro* süsteemide uurimisel (Shastri *et al.*, 2001).

1.7 Sekreetograanin 3 (SGC3)

SGC3 valk kuulub graaninite valkude perekonda, mida ekspresseeritakse endokriinsetes ja neuraalkudedes (Chuan *et al.*, 2013). Tegu on happeliste valkudega ning neid võib leida sekretoorsetes graanulites. Nende valkude täpne funktsioon ei ole hetkel teada, aga on täheldatud nende aktiivsust prohormoonidena, mille puhul on tegemist hormoonide eelvormi seisundis oleva näärmevälise ainega, mille hormonaalne bioaktiivne toime organismides on minimaalne. Prohormoonide autokriinset, parakriinset ja endokriinset aktiivsust on näidatud nii in vitro kui ka in vivo (Wieland *et al.*, 2002).

2.EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1 Töö eesmärk

Bakalaureusetöö eesmärk on konstrueerida plasmiidne geeniekspressioonisüsteem, mis ekspresseerib reportergeeni (Luc2) koespetsiifiliselt ning testida selle potentsiaalset kasutusvõimalust närvikoe-spetsiifiliselt geeni ekspresseerimiseks.

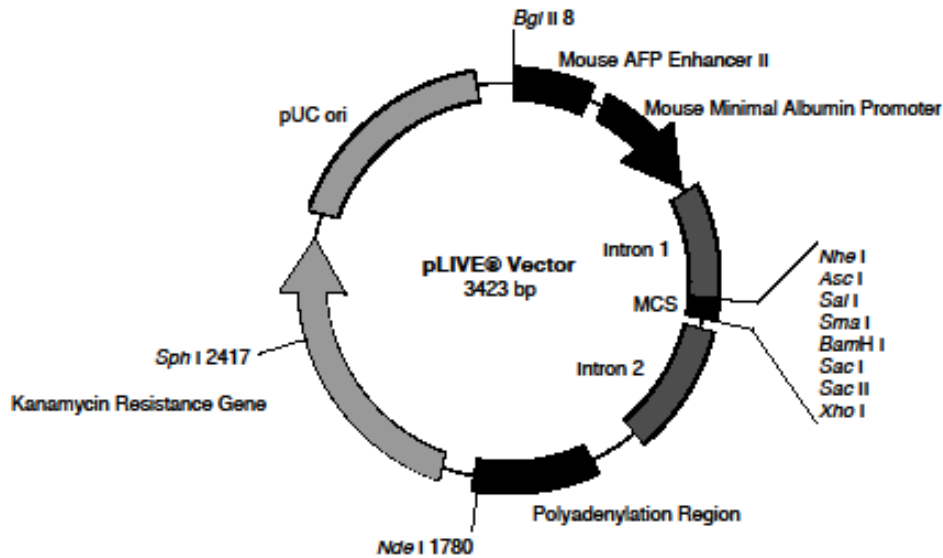
Eesmärgi saavutamiseks on vaja lahendada alljärgnevad ülesanded:

1. Plasmiidi disain
2. Teostada kloneerimine, mis lõpeb soovitud plasmiidi saamisega ja sisaldab närvikoe-spetsiifilist promootor-enhancer kasseti ning Lutsiferaasi geeni
3. Testida plasmiidi efektiivsust *in vitro* , transfekterides plasmiidi nii neuraalsetesse kui mitteneuraalsetesse rakkudesse, kasutades PF14 abi.

2.2 Materjalid ja metoodika

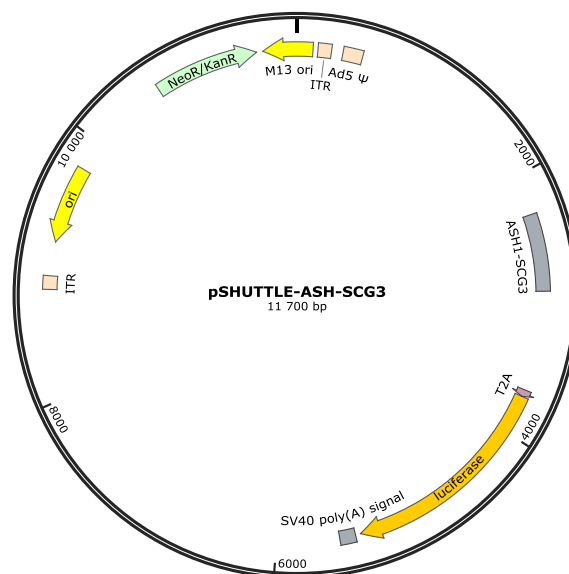
2.2.1 Plasmiidi disain

Soovitud tulemuse saamiseks kasutati kolme komponenti kolmest eri plasmiidist. Plasmiidi disainiks kasutati programmi Snapgene. Plasmiidi põhjaks kasutati firma Mirusbio (USA) poolt produtseeritud pLIVE vektorit, mille puhul on tegu reportervektoriga, mis on disainitud pikaajaliseks ekspressiooniks labori hiirte maksas. See plasmiid on 3423 bp pikk ning sisaldab kanamütsiiniresistentsusgeeni. Antud plasmiidist planeeriti eemaldada hiire minimaal albumiini promootor ja hiire alfa fetoproteiini enhancer.



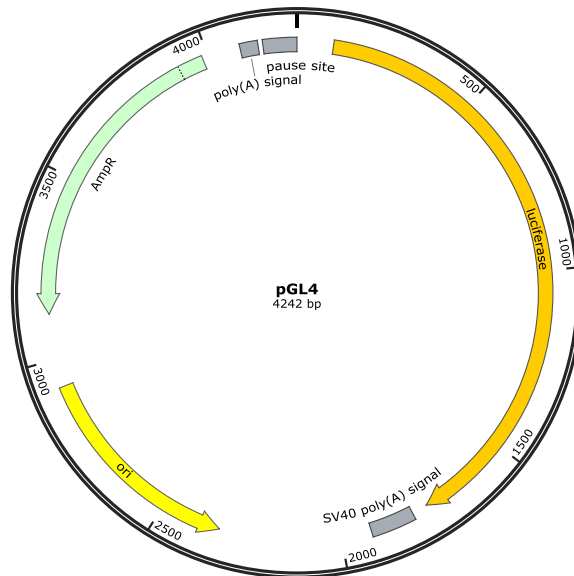
Joonis 1: Plasmiidi pLIVE vektorikaart (Mirusbio, 2015)

Eemaldatud promootor-enhancer planeeriti asendada Sekreetograanin 3 (SCG3) promootoriga ja inimese ASH1 enhanceriga (*human achaete-scute complex homolog 1*), mis saadi pSHUTTLE-ASH-SCG3 plasmiidist. Antud plasmiid sisaldab samuti kanamütsiiniresistentsusgeeni. Plasmiid saadi Uppsala ülikoolist (Chuan *et al.*, 2013) ning sellega oli eelnevalt sooritatud katseid eesmärgiga luua neuroblastoomi spetsiifiline onkolüütiline adenoviirus.



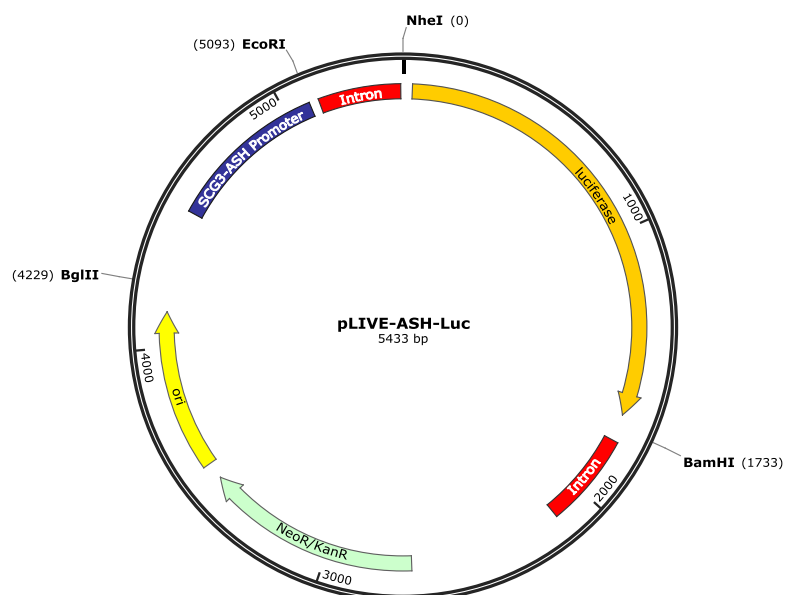
Joonis 2: pSHUTTLE-ASH-SCG3 plasmiidi vektori kaart (Chuan *et al.*, 2012).

Lutsiferaasi kodeeriv Luc2 geen saadi pGL4.51 vektorist, mis on toodetud firma Promega (USA) poolt.



Joonis 3: pGL4 vektori kaart

Lõpuks kloneeriti vastavad lõigud kokku ning sisestati ühte vektorisse, mille tulemusel saadi vektor, mida sooviti ning mille efektiivsust edasi testima hakati.



Joonis 4: pLIVE-ASH-Luc plasmiid, joonisel toodud samuti lõikesaidid, millega restriksioone ning hiljem ligatsiooni sooritati

2.2.2 Plasmiidi süntees ja paljundamine

Kloneerimist alustati pLIVE vektori (joonis 1) ja pSHUTTLE-ASH-SCG3 (joonis 2) vektori praimerite disainimisega, eesmärgiga eemaldada pLIVE vektorist enhancer ja promootor ning paljundada pSHUTTLE-ASH-SCG3 plasmidist SCG3 promootor ja ASH1 enhancer. Praimerid disainiti kasutades olemasolevaid vektorikaarte ning nende sünteesi teostas firma Microsynth (Šveits) (Tabel 1). Nende praimeritega sooritati PCR. Järgmise kloneerimise etapina sooritati restriksioon mõlema PCRi produktiga. Selleks kasutati restriктаase BglII ja EcoRI (joonis 4). Järgnevalt ligeeriti restrikreeritud produktid kokku. Plasmiidi paljundamiseks kasutati *Escherichia coli* tüve DH5 α (Invitrogen). Selle tüve puhul on tegu juba transformatsiooni kompetentsete rakkudega. Eksperimendi sooritamiseks kasutati tootja poolset protokollit. Kolooniaid kasvatati LBKan söötmetel (100 μ g/ml) 24h 37 $^{\circ}$ C juures. Plasmiidne DNA eraldati bakterirakkudest kasutades FavorPrep *Plasmid DNA Extraction Mini kit*-i (Favorgen Biotech Corp.) Järgmise etapina disainiti lutsiferaasi reportergeeni Luc2-e eraldamiseks pGL4.10[luc2] (joonis 3) vektorist praimerid (Tabel 1), sooritati PCR ning seejärel lõigati ensüümidega BamHI ja NheI (joonis 4). Samuti lõigati varem konstrueeritud plasmidi pLIVE-ASH samade ensüümidega. Seejärel ligeeriti lõigud kokku ning transformeeriti, kasvatati ja eraldati DNA samamoodi nagu eelnevalt kirjeldatud.

2.2.1.1 PCR-i läbiviimine

PCR viidi läbi kasutades *Pfu* DNA polümeraasi ja vastava tootja (Thermo Scientific) protokollit. 50 μ l lõppmahuga reaktsioonisegu sisaldas 5 μ l 10x *Pfu* puhvrit, 5 μ l 25mM MgSO $_4$, 1 μ l dNTP segu(10 μ M), 1 μ l nii *forward* kui *reverse* praimereid (20 μ M), 1 μ l märklaud DNA-d, 1 μ l *Pfu* DNA polümeraasi ning 35 μ l MQ vett.

PCR-i programm:

1. 95 $^{\circ}$ C	3 min	} 35 tsüklit
2. 95 $^{\circ}$ C	30 sek	
3. 55 $^{\circ}$ C	30 sek	
4. 72 $^{\circ}$ C	7 min	
5. 72 $^{\circ}$ C	15 min	
6. 4 $^{\circ}$ C	∞	

Tabel 1. Töös kasutatud praimerid

<i>pLIVE_Foward</i>	5' – CCA TAT AGG CGG TAA ACT GAA CTC TGC CAT C - 3'
<i>pLIVE_Reverse</i>	5'- AAT TCA GCC TCT GGC AAA GGT ACC – 3'
<i>SCG3-ASH_Foward</i>	5' – AAT TCA CAC TCG ACG GTC AAG GGA TAA G – 3'
<i>SCG3-ASH Reverse</i>	5' – CCA TAT AGG CTT ATA AAT CTA CAG GGT AAT CTT GA – 3'
<i>Luc_Foward</i>	5' – CTA GCG GCA ATC CGG TAC TGT TGG – 3'
<i>Luc_Reverse</i>	5' – GAT CCT ATC ATG TCT GCT CGA AGC G – 3'

2.2.1.2 Plasmiidi kontrollimine geel-elektroforeesiga

Enne sekveneerimist sooritati disainitud plasmiidiga DNA ahela pikkuse kontrolliks ka geel-elektroforees. Forees sooritati 1% agarosgeelis, kuhu oli lisatud Etiidium Bromiidi (EtBr), TAE puhvris. Markeriks kasutati ZipRuler 10 000 bp DNA ladder (*Thermo Scientific*). Geelile kanti 5 µl proovi, kuhu oli lisatud 1 µl Orange DNA Loading Dye (6x) (*Life Technologies*).

2.2.1.3 Sekveneerimine

Saadud konstrukti järjestuse määramiseks ning kontrollimiseks, kas promootor-enhancer kassett ning reporter geen on sisenenud plasmiidi planeeritud kohtadesse kasutati Sangeri ensümaatilist meetodit ning proovid saadeti Tartu Ülikooli DNA genotüpiseerimise ja sekveneerimise tuumiklaborisse.

Reaktsioonid DNA paljundamiseks enne sekveneerimist üldmahuks 25µl, sisaldasid: 0,5 µl plasmiidi pLIVE-ASH-Luc kolooniat, 2,5µl 10x lahjendamispuhvrit Taq, 0,5 µl dNTP mix (10µM), 0,5µl polümeraasi Taq (5 U/ µl) , 2,5 µl MgCl₂ (25 mM), 0,5µl praimerit Luc_Reverse ja 0,5 µl SCG3-ASHI-forward praimerit (20 µM), üldmahuni destilleeritud vett.

Proove töödeldi PCR-i masinas tingimustel:

1. DNA denaturatsioon 95°C 15 sek
2. Praimeri seondumine 55°C 15 sek
3. DNA süntees 60°C 2 min.

Tsükleid korrati 30 korda.

Eraldamaks PCR-i reaktsioonisegust kasutamata jäänud praimerid ja dNTP-d lisati 5µl-le proovile 1µl aluselist fosfataadi SAP (1U/µl) ja 0,3µl eksonukleas I (20U/µl). Proove töödeldi termoblokis tingimustel: 30 minutit 37°C, ensüümide inaktiveerimine 15 minutit 80°C. Proovid sekveneeriti TŮMRI automaatsekvenaatoril (Applied Biosystems). Saadud tulemuste analüüsiks kasutati programmi „BioEdit 7.2.2“ ja võrreldi NCBI GenBank andmebaasis olevate järjestustega, kasutades programmi Blast.

2.2.3 Kasutatud rakuliinid ja nende kasvatamine

Katsetes kasutati SK-N-AS, N2A, U87 ja CHO rakuliine. SK-N-AS ja N2A rakuliinide puhul on tegu inimese neuroblastoomi rakkudega. U87 rakuliin on inimese glioblastoomi rakuliin. CHO on hiina hamstri munasarjarakkudega. Rakke kasvatati DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) söötmes, millesse oli lisatud 10% veise loote seerumit (FBS), 0,1 mmol/L asendatavaid aminohappeid ja 1,0 mmol/L naatriumpüruvaati. Rakke kasvatati 5% CO₂ keskkonnas veeauruga küllastatud atmosfääris temperatuuril 37°C ja neid külvati ümber 2-3 päeva järel. Pestes neid eelnevalt 5ml fosfaatpuhvriga (PBS) ning seejärel eemaldades rakud plaadi küljest kasutades 1ml trüpsiini, mille järel lisati sobiv kogus söödet ning külvati vajalik kogus rakke edasi järgmisele plaadile.

2.2.4 Plasmidi transfektsioon rakkudesse

Eelpool mainitud rakuliine transfekteeeriti kasutades PepFect peptiidi PF14 ja Lipofecatmine 2000 (LF 2000) reagenti. Katsele eelneval päeval külvati rakud 24-kaevulisse plaati tihedusega 50 000 rakku kaevu kohta. Katse päeval vahetati algselt rakkudel sööde ning seejärel valmistati kompleksid transfektsiooni alustamiseks. LF 2000 transfektsiooniks talitati vastavalt tootjapoolsele protokollile, mille alusel segati algselt omavahel kokku Lipofecatmine reagent Opti-MEM seerumiga ning samal ajal segati DNA kokku Opti-MEM seerumiga. Peale inkubatsiooniaega, milleks oli 20 minutit, segati DNA konsentratsiooniga 5µg/µL ja LF 2000 omavahel ning inkubeeriti veel viis minutit. Seejärel oli võimalik DNA-lipiid kompleksid pipeteerida kaevikutesse, kus rakkudele oli lisatud juba 400µl DMEM söödet. PF14 komplekside jaoks valmistati kompleksid pDNast (0,5 µg), mis segati kokku MQ vees erinevatel peptiid:plasmiid laengusuhtel (CR) PF14-ga, lõppmahus 50µl/well.

pDNA-na kasutati loodud vektorit pLIVE-ASH-LUC ja kontrollina vektorit pLUC, mis sisaldab lutsiferaasi geeni. Komplekse inkubeeriti peale valmimist 20 minutit ning seejärel transfekteeriti kaevikutesse, kuhu rakkudele oli eelnevalt lisatud juba 450 µl DMEM söödet. Peale seda inkubeeriti rakke neli tundi 37°C kraadi juures CO₂ keskkonnas ning seejärel lisati veel 500 µl DMEM söödet. Lõpuks inkubeeriti rakke samasuguses keskkonnas veel 24 tundi ning selle möödudes eemaldati sööde ja lüüsiiti rakud kasutades Triton-X100 0,1% lahust PBS-is. Peale lüüsilahuse lisamist hoiti rakke 15min 4°C kraadi juures. Lutsiferaasi aktiivsus mõõdeti kasutades GLOMAX 96 mikroplaat luminomeetrit (Promega). Selleks lisati 20µl rakulüsaati valgele 96-kaevulisele plaadile (Greiner Bio One) ja seejärel 80µl *Luciferase Assay Reagent*'i (Promega). Antud proovide valgu sisaldust mõõdeti Sunrise Tecan mikroplaat absorptsioonlugejaga, kasutades tootjapoolset protokollit. Mõõdetud RLU väärtused normaliseeriti valgu sisalduse vastu ning analüüsiti seejärel tabeltöötlusprogrammiga Excel (Microsoft).

2.3 Tulemused ja arutelu

2.3.1 SCG3-ASH promootor-enhancer

Katsetega sooviti saada neuroblastoomi-spetsiifilist ekspressiooni, seda eeldusel, et varasemates *in vivo* katsetes hiire loomudelites on neuroblastoomi kasutatud (Veiman et al, 2015). Luues neuroblastoomi spetsiifilise plasmidi saaksime suurendada veel lähenemise ohutust, sest sellisel juhul saavutaksime ekspressiooni vaid tuumoris.

Sellise spetsiifilise ekspressiooni saavutamiseks kasutati spetsiaalset promootor-enhancer kassetit. See saadi Uppsala Ülikoolis (Chuan et al, 2013) sooritatud katsetes kasutatud vektorist pSHUTTLE-ASH-SCG3. Antud plasmidis asuvate promootori ja enhanceri spetsiifilisust neuroblastoomi rakuliinides oli varasemalt tuvastatud seoses katsetega luua neuroblastoomi spetsiifiline onkolüütiline adenoviirus. Vastavate katsetega alustati, kuna Sekreetograanin III ekspressiooni on tuvastatud neuroendokriinsetes kasvajates ning neuroblastoomis (Portela-Gomes *et al.*, 2010). Samuti inimese ASHI enhancer on näidanud koe-spetsiifilist ekspressiooni neuro-endokriinsetes tuumorites (Chen *et al.*, 1997). Seega, antud väidetele tuginedes oodati vastavat promootorit ja enhancerit kasutades saavutada ekspressiooni ka vastava töö jaoks kasutatud neuraalsetes rakuliinides.

2.3.2 Lutsiferaasi geen

Selleks, et vastava plasmidi ekspressiooni rakkudes tuvastada oli vaja plasmiidile lisada ka reportergeen. Valikus on mitmeid erinevaid reportergeene, nagu näiteks eGFP või Luc. Antud töö puhul valiti katsete sooritamiseks ensüüm lutsiferaas, mis põhjustab bioluminestsentsi ehk helendamist põhjustavat reaktsiooni lutsiferiiniga. Bioluminestsents tekib lutsiferiini reageerimisel hapnikuga, mida on võimalik mõõta luminomeetriga ning juhul kui reportergeeniga vektor on rakku transfekteerunud on selle alusel võimalik määrata geeni ekspressiooni efektiivsust. Lutsiferaas võimaldab edasistes katsetes detekteerida ka geeni ekspressiooni elusloomas ja samuti on Luc-i puhul tegemist ühe tugevama üldise signaali tekitajaga võrreldes mõne teise reportersüsteemiga. Selle jaoks saadigi pGL4.10[Luc2] vektorist Lutsiferaasi geen, mis kloonitakse disainitavasse plasmidi, et mõõta transfektsiooni efektiivsust.

Teine laialdaselt kasutusel olev reportergeen on GFP (*green fluorescent protein*, roheline fluorestseeruv valk), mille abil on võimalik rakkude valgustamisel geen üles leida ja uurida, kas see on sisse lülitatud, ning kui see toodab valku, siis välja selgitada, kus seda toodetakse ja kuhu see edasi liigub. Läbi GFP kasutamise oleks saanud kindlaks määrata millistes rakupopulatsioonidest või koelõikudest signaal saabub, seda seetõttu, et GFPga märgistatud rakke on võimalik ka mikroskoobi all vaadelda, seega saab identifitseerida GFP-positiivseid rakke ning vaadata sub-tsellulaarset paiknemist. Uuringute edasistes etappides kui edasi liigutakse histoloogia juurde, on GFP kindlasti samuti väga vajalik reportergeen.

Eelmainitud põhjustel otsustati selle katse esimeses faasis kasutada just lutsiferaasi kodeerivat Luc2 geeni, sest esimestes etappides on vaja tugevamat signaali ning võrreldes Luc-iga on GFP nõrgem ning pole nii tundlik kui seda on Luc.

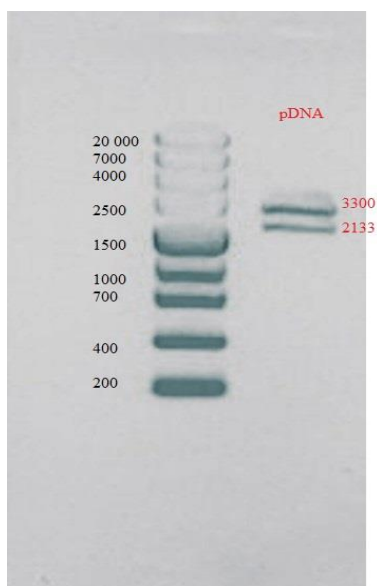
2.3.3 pLIVE vektor

Promootor-enhancer kassett ning reportergeen oli aga vajalik sisestada vektori põhja, selleks valiti pLIVE (Mirusbio), mille puhul on tegu maksa spetsiifilise vektoriga. Soovitud plasmidi saamiseks oli vajalik eemaldada sealt hiire alfa fetoproteiini enhancer ja hiire minimaal albumiini promootor. Valiti just see kommertsiaalne vektor, sest selle ekspressioon *in vivo* püsib pikemalt, erinevalt näiteks pGL3 või pGL4 vektoritest, mis kaotavad kiirelt aktiivsuse.

Nende plasmiidide promootori ning plasmidi üldise põhja aktiivsuse kao võib suure tõenäosusega põhjustada ebakõlad koodon-ehituselt eukarüoodiga, kuigi on ka võimalus, et aktiivsuse languse põhjuseks võib lugeda ka näiteks reportergeeni aktiivsuse langust.

2.3.4 Konstrukti kontroll

Lõpp-produkti kontrolliks sooritati pLIVE-ASH-LUC-iga restriksiooni analüüs ning lõigati vektorit restriksiooniensüümiga HindIII (Promega). Lõikusena tekkivate fragmentide suurus on oodatavalt 2133 ja 3300 aluspaari. Nagu jooniselt näha, siis on antud fragmendid vastava suurusega ning kinnitavad seeläbi vektori korrektsust.



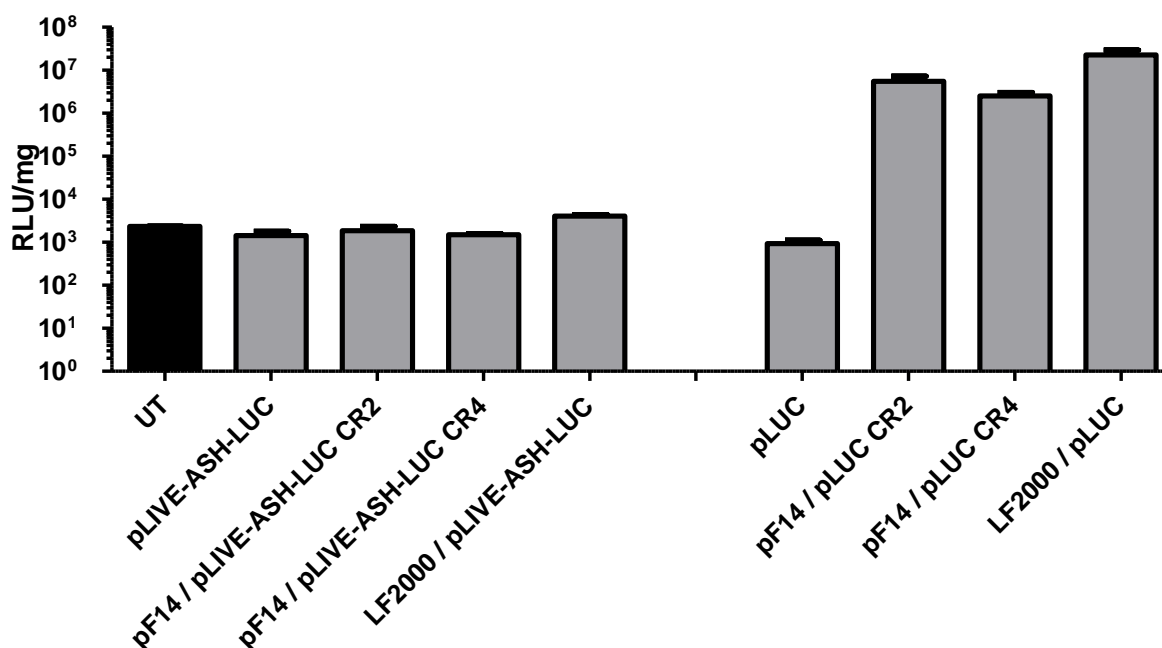
Joonis 5: Geel-elektroforees. Sünteesitud produkti pLIVE-ASH-LUC kontroll lõikamisel ensüüm HindIII-ga. Joonisel märgitud markeri Zipladder DNA ladder 2-e suurused ning korrektsete fragmentide suurused.

2.3.5 Plasmidi testimine *in vitro* koekultuuri tingimustes

Töö eesmärk oli saavutada konstrueeritud plasmidi aktiivsus närvikoe rakuliinides, et tõestada promootor-enhancer-i närvikoe rakuliinide spetsiifilisus. Töös kasutati SK-N-AS ja N2A rakke, mille puhul on inimese neuroblastoomi rakkudega, U87 rakke, mis on glioblastoomi rakud ning CHO rakke, mille puhul on tegu hiina hamstri munasarja rakkudega. Transfektsiooniks kasutati LF 2000 reagenti ning peptiidset reagenti PF14. Kontrolliks

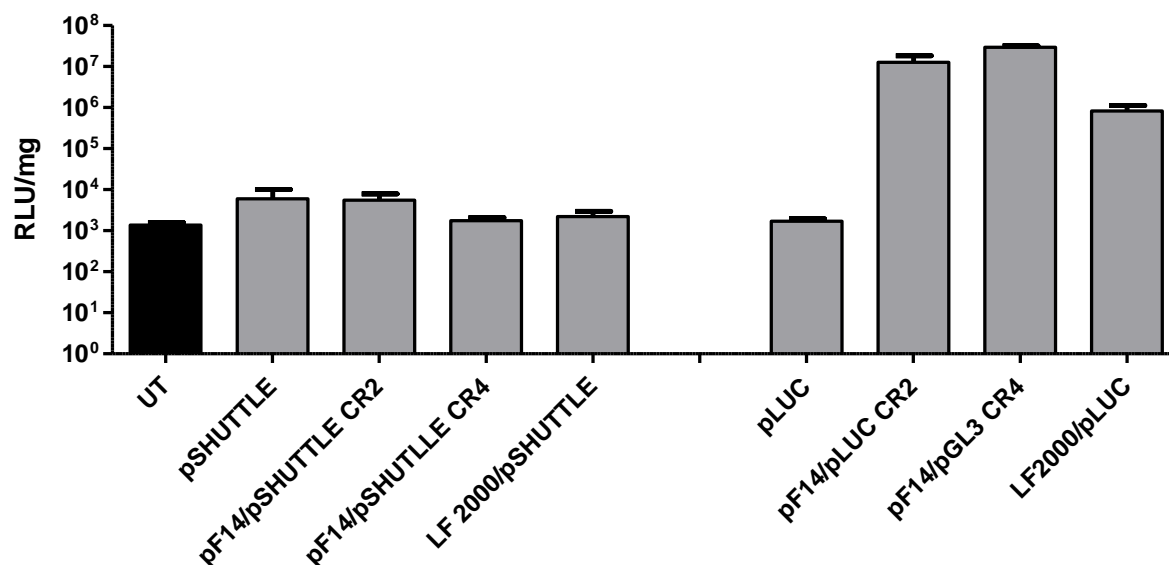
sooritati paralleelselt sama katse pLUC (Addgene) plasmidi ning hiljem originaalse pSHUTTLE-ASH-SCG3 plasmidiga. pLUC sisaldab Lutsiferaasi kodeerivat Luc geeni.

Nagu jooniselt 6 näha, siis pLIVE-ASH-LUC transfektsiooni järel Luc ekspressioon ei ole tuvastatav, seda nii kasutades PF14 kui ka LF2000. Kontrollina sooritatud pLUC-i (Addgene) ekspressioon on aga selgelt mõõdetav. Un treated (UT) tähistab ilma plasmiidita rakke.



Joonis 6: pLUC ja pLIVE-ASH-LUC transfektsiooni efektiivsus SK-N-AS rakkudes, PF14 laengu väärtuste 2 ja 4 juures ning Lipofecatmine 2000-ga.

Kuna transfektsioon pLIVE-ASH-LUC konstruktiga neuroblastoomi rakkudes ei toiminud vastavalt oodatavatele tulemustele otsustati transfekteeida samadesse rakkudesse samades tingimustes ja sama kontrolliga ka algne vektor pSHUTTLE-SCG3-ASH, kust vastav promootor oli saadud. Nagu joonisel 2 näha on ei ekspresseerunud ka see vektor neuroblastoomi rakkudes, kuigi vastava info põhjal antud katsetega alustati.



Joonis 7: pLUC ja pSHUTTLE transfektsioon SK-N-AS rakkudes, pF14 laengu väärtuste 2 ja 4 juures ning Lipofecatmine 2000-ga

Transfektsiooni ei olnud võimalik detekteerida üheski rakuliinis, ei neuraalsetes ega ka mitteneuraalsetes. Kuigi ideaaltingimustel oleks ekspressioon pidanud toimuma neuraalsetes rakkudes ja mitte neuraalsetes ei oodatudki tulemusi. Tulemustele tuginedes võib SCG3-ASH promootor-enhancer kassetti efektiivust neuraalsetes kudedes kaheldavaks lugeda ning selle kasutamisevõimaluse koospetsiifilise plasmidi loomiseks võib sellistes tingimustes välistada.

Lähtudes tulemustest selle promootor-enhancer kassettiga loodud vektoriga katseid ei jätkatud, kuid kindlasti tuleb edaspidi otsida veel lahendusi ja lähenemisi, kuidas kasvajate ravile läbi geeniteraapia läheneda ja seda just plasmiidide konstrueerimise valdkonnas, sest nii on võimalik tagada turvaline ja ainult vastava tuumori spetsiifiline lähenemine.

3.KOKKUVÕTE

Geeniteraapia on väga oluline tuleviku suund, millele kindlasti tuleb ka edasipidi väga põhjalikult tähelepanu pöörata, seda eriti kasvajate valdkonnas. Luues ravimeid, mis mõjuksid ainult huvipakkuvale kasvajale oleks võimalik muuta paljude inimeste elukvaliteeti ning päästa suurel hulgal elusid.

Antud töö eksperimentaalse osaga sooviti saavutada neuroblastoomi spetsiifilise ekspresiooniga transfektsioonivektor, mis eelistatult viib DNA ajukoosse. Selleks oli vaja erinevatest plasmiididest saadud osadest disainida plasmiid, mis sisaldab lisaks vektori põhjale, neuroblastoomi spetsiifilist promootorit ning ekspressiooni tabamiseks reportergeeni. Vektori põhjaks valiti pLIVE, sest võrreldes teiste kommertsiaalsete vektoritega on tema toimet *in vivo* kõige pikaajalisemaks hinnatud. Neuroblastoomi spetsiifiline promootor-enhancer saadi pSHUTTLE-ASH-SCG3 plasmiidist, mida oli eelnevalt Uppsala Ülikoolis (Chuan *et al.*, 2012) sooritatud katsetes kasutatud kui loodi onkolüütiline adenoviirus neuroblastoomi raviks. Reporteriks valiti lutsiferaas tema tundlikuma ning tugevama signaali pärast, samuti on lutsiferaasi võimalik edasistes katsetes detekteerida elusloomas.

Katsete tulemused näitasid, et kuigi plasmiid konstrueeriti vastavalt plaanile ning ka sekveneerimis tulemused vastasid oodatule, siis rakkudes selle plasmidi ekspressiooni detekteerida ei suudetud. Põhjuseks võib lugeda tulemustele tuginedes promootor-enhanceri ebasobivust koespetsiifilise plasmidi loomiseks loodud tingimustes.

Siiski on sellisel lähenemisel väga palju potentsiaali ning edasipidi tuleb leida muid lähenemisi, kuidas närvisüsteemi kasvajaid sihtida just spetsiifiliste plasmiididega.

4.SUMMARY

„Design of a Tissue specific plasmid”

Mirjam Tamme

Gene therapy has an important role in modern medicine, especially when it comes to tumor targeting and treatment. Although surgical methods are also developing fast, we are still far from there, where we can remove tumors fully thorough mechanical apporach. In order to solve this, gene therapy aims to that direction to develop safe and efficient ways to deliver genetic material to the cell.

The aim of this thesis was to design a plasmide reporter system, which would express the reporter gene (Luc2) tissue specific and to test the potential usage to express the gene nervous tissue specific. The plasmid would make the approach to tumor targeting safer, because so we can guarantee the expression of the gene only in tumor area.

In order to achieve the goal there were selected Secretogranin III (SCG3) promoter, which belongs to the granin family and is highly expressed in endocrine and neural tissues and human achaete-scute complex homolog (ASH1) enhancer. The tissue selectivity of this promoter-enhancer cassette was identified by experiments which were developed by an oncolytic adenovirus, in which the SCG3 promoter and ASH1 enhancer drive E1A gene expression. As a reporter gene was selected luciferase (Luc2), due to its stronger signal and the capability to quantify the expression better. As the third part of the vector was selected the vector basis, which was pLIVE(Mirusbio). This vector was chosen amongst others due to its stable and longer expression in *in vivo* experiments.

The plasmid was cloned together step by step and sequenced afterwards to control the steps. The plasmid was transfected into several cell lines – SK-N-AS and N2A, which both are human neuroblastoma cell lines, then U87 cells, which are human glioblastoma cell lines and as well as non neural cell line, CHO, which are Chinese Hamster ovary cells. After transfection there was detected no expression of the created plasmid in any of the cell lines, although in nervous system cell lines the expression should have been detected due to the promoter-enhancer specificity to neural cell lines. Still the approach has a lot of potential for future usage and new methods to combine tissue specific expression driving plasmids in tumor targeting will improve life quality for a lot of people.

5.KIRJANDUSE LOETELU

Alberts B (2002) „Molecular Biology of the Cell’’ New York, Garland Science

Bockamp Ernesto, Maringer Marko, Spangenberg Christian, Fees Stephan, Fraser Stuart, Eshkind Leonid, Oesch Franz, Zabel Bernhard (2002) „Of mice and models: improved animal models for biomedical research’’ Physiological Genomics

Cappecchi MR. (1980) „High efficiency transformation by direct microinjection of DNA into cultured mammalian cells.’’ Cell

Ezzat Kariem, EL Andaloussi Samir, Zaghoul Eman M., Lehto Taavi, Lindberg Staffan, Moreno Pedro M. D., Viola Joana R., Magdy Tarek, Abdo Rania, Guterstam Peter, Sillard Rannar, Hammond Suzan M., Wood Matthew J. A., Arzumanov Andrey A., Gait Michael J., Smith C. I. Edvard, Hällbrink Mattias, and Langel Ülo (2011) „PepFect 14, a novel cell-penetrating peptide for oligonucleotide delivery in solution and as solid formulation’’, Nucleic Acids Research

Fan F, Wood KV (2007) „Bioluminescent assays for high-throughput screening’’, Assay Drug Dev Technol

Fraga H, Frenandes D, Novotny J, Fontes R, Esteves da Silva JC (2006) „Firefly luciferase produces hydrogen peroxide as a coproduct in dehydroluciferyl adenylate formation’’ ChemBiochem

Freshney, Ian R. (2010) „Culture of Animal Cells: A manual of basic technique.’’ John Wiley & Sons

Goff S, Berg P (1988) „Construction of hybrid viruses containing SV40 and λ phage DNA segments and their propagation in cultured monkey cells’’ Cell

Gould SJ, Subramani S (1988) "Firefly luciferase as a tool in molecular and cell biology". Anal. Biochem.

Graham FL, van der Eb AJ (1973) „A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA” Virology

Green Maurice, Loewenstein Paul M. (1988) „Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein.” Cell

Hollon Tom (2000) „Researchers and regulators reflect on first gene therapy death” Nature America

Ignatovich, I. A, Dizhe, E. B., Pavlitskaya, A. V., Akifiev, B. N., Burov, S. V., Orlov, S. V.; Perevozchikov, A. P. (2003) „Complexes of plasmid DNA with basic domain 47–57 of the HIV-1 Tat protein are transferred to mammalian cells by endocytosis-mediated pathways.” J.Biol. Chem

Jachoon Koo, Yumi Kim, Jeongsik Kim, Miji Yeom, In Chul Lee and Hong Gil Nam (2007) „A GUS/Luciferase Fusion Reporter for Plant Gene Trapping and for Assay of Promoter Activity with Luciferin-Dependent Control of the Reporter Protein Stability” Plant Cell Physiology

Jin Chuan, Yu Di, Cancer Matko, Nilson Berith, Leja Justyna and Essand Magnus (2013) „Tat-PTD-Modified Oncolytic Adenovirus Driven by the SCG3 Promoter and ASH1 Enhancer for Neuroblastoma Therapy”, Human Gene Therapy

Kaestner L., Scholz A., Lipp P. (2015) „Conceptual and technical aspects of transfection and gene delivery.” Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters

Lodish H, Berk A, Zipursky SL, et al. (2000) „Molecular Cell Biology” 4th edition . New York: W. H. Freeman

London W.B. Castleberry R.P. Matthay K.K., (2005) „Evidence for an age cutoff greater than 365 days for neuroblastoma risk group stratification in the Children's Oncology” Group. J. Clin. Oncol

Maris J.M.(2010) „Recent advances in neuroblastoma.” N. Engl. J. Med

Milletti F (2012) „Cell-penetrating peptides: classes, origin, and current landscape.” Drug Discovery Today

Mäe, M., EL Andaloussi, S., Lehto, T., Langel, Ü. (2009)„Chemically modified cell-penetrating peptides for the delivery of nucleic acids.” Expert Opin. Drug Delivery

Mäe M, Langel Ü. (2006) „Cell-penetrating peptides as vectors for peptide, protein and oligonucleotide delivery.” Current Opinion in Pharmacology

Okuyama M, Laman H, Kingsbury S.R, Visintin C, Leo E, Eward K.L, Stoeber K, Boshoff C, Williams G.H, Selwood D.L (2007) „Small molecule mimic of an α -helix for efficient transport of proteins into cells” Nature Methods

Parissis D, Mellidis C, Boutis A, Apostolidis K, Ignatiadis M, Kiosses V, Milonas I (2003) „Neurological findings in a case of coma secondary to *Datura stramonium* poisoning” European Journal of Neurology

Portela-Gomes G.M. Grimelius L. Stridsberg M. (2010) „Secretogranin III in human neuroendocrine tumours: A comparative immunohistochemical study with chromogranins A and B and secretogranin II”. Regul. Pept

Shastry P, Basu A, Rajadhyaksha MS. (2001) „Neuroblastoma cell lines--a versatile in vitro model in neurobiology.” International Journal of Neuroscience

Shigekawa K, Dower WJ. (1988) „Electroporation of eukaryotes and prokaryotes: a general approach to the introduction of macromolecules into cells.” Biotechniques

Stanley J (2000) „Nervous System Tumor overview” Health Communities

Thomas Christopher M, Summers D (2008) „Bacterial Plasmids’,

Tsien R (1998) „The Green Fluorescent protein” Annual Review Biochemistry

Veiman Kadi-Liis, Mägi Imre, Ezzat Kariem, Margus Helerin, Lehto Tõnis, Langel Kent, Kurrikoff Kaido, Arukuusk Piret, Suhorutšenko Julia, Padari Kärt, Pooga Margus, Lehto Taavi and Langel Ülo (2013) „PepFect14 Peptide Vector for Efficient Gene Delivery in Cell Cultures”, Molecular pharmaceutics

Veiman K-L, Kunnapuu K, Lehto T, Kiisholts K, Pärn K, Langel Ü, Kurrikoff K (2015) „PEG shielded MMP sensitive CPPs for efficient and tumor specific gene delivery in vivo” J Control Release

Vorburger SA, Hunt KK. (2002) „ Adenoviral gene therapy.” Oncologist.

Ziegler, A.(2008) “Thermodynamic studies and binding mechanisms of cell-penetrating peptides with lipids and glycosaminoglycans.” Adv Drug Deliv,

Wang W., Li W., Ma N., Steinhoff G. (2013) „ Non-Viral Gene Delivery Methods.” Current Pharmaceutical Biotechnology

Wieland B. Huttner; Hans Hermann Gerdes; Patrizia Rosa (2002) „The granin-(chromogranin/secretogranin) family” , Trends in Biochemical science

Yanisch-Perron C, Vierira J, Messing J (1985) „Improved M13 phage cloning vectors and host strains:nucleotide sequences of the M13mp18 and Puc19 vectors.

Yla-Herttuala S (2012) „Endgame: Glybera finally recommended for approval as the first gene therapy drug in the European union” Mol Therapy

Kasutatud veebileheküljed

Boundless „ Types of Plasmids and their Biological Significance ” 18.05.2015

(<https://www.boundless.com/microbiology/textbooks/boundless-microbiology-textbook/microbial-genetics-7/plasmids-74/types-of-plasmids-and-their-biological-significance-423-5367/>)

University of Utah, Health Sciences „Challenges in gene therapy” 21.05.2015

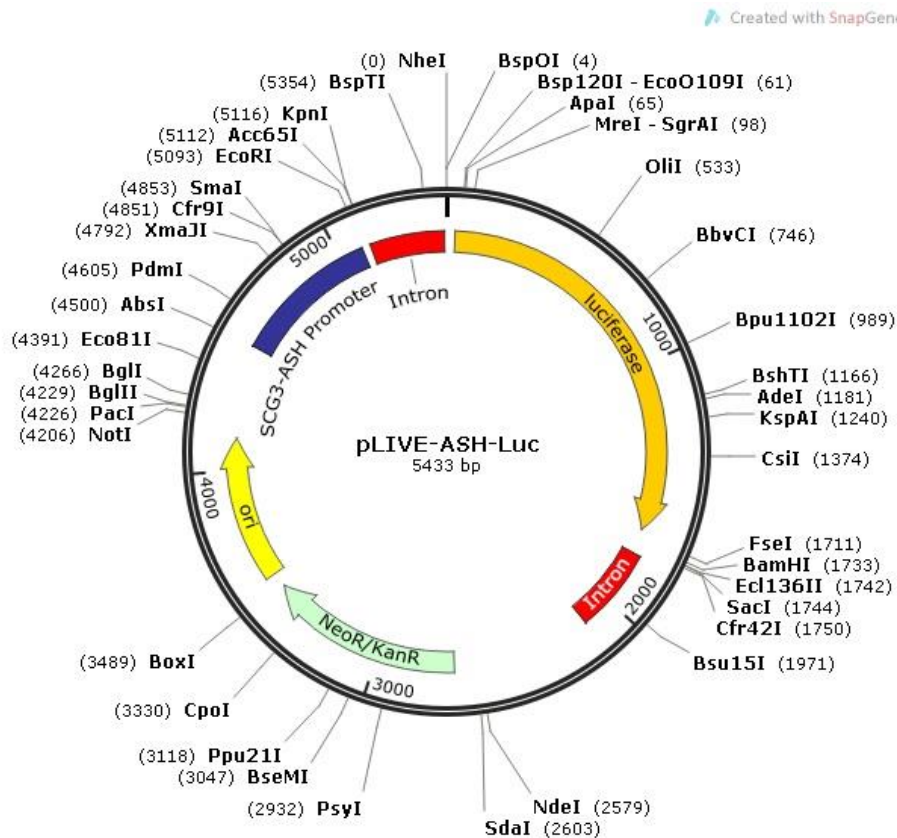
(<http://learn.genetics.utah.edu/content/genetherapy/gtchallenges/>)

Mirusbio product sheet, 22.05.2015

(<https://www.mirusbio.com/products/in-vivo/plive-in-vivo-expression-and-reporter-vectors>)

6.LISAD

6.1 LISA 1 Plasmiidi pLIVE-ASH-Luc järjestus



Luciferase – 35 - 1687

KanR– 2686 – 3480

SCG3-ASH Enhancer-Promootor – 4506 - 5092

CTAGCGGCAATCCGGTACTGTTGGTAAAGCCACCA**TGGAAGATGCCAAAAACATT**
AAGAAGGGCCCAGCGCCATTCTACCCACTCGAAGACGGGACCGCCGGCGAGCAG
CTGCACAAAGCCATGAAGCGCTACGCCCTGGTGCCCGGCACCATCGCCTTTACCG
ACGCACATATCGAGGTGGACATTACCTACGCCGAGTACTTCGAGATGAGCGTTTCG
GCTGGCAGAAGCTATGAAGCGCTATGGGCTGAATACAAACCATCGGATCGTGGT
GTGCAGCGAGAATAGCTTGCAGTTCTTCATGCCCGTGTTGGGTGCCCTGTTTCATCG

GTGTGGCTGTGGCCCCAGCTAACGACATCTACAACGAGCGCGAGCTGCTGAACA
GCATGGGCATCAGCCAGCCCACCGTCGTATTCGTGAGCAAGAAAGGGCTGCAAA
AGATCCTCAACGTGCAAAAGAAGCTACCGATCATACAAAAGATCATCATCATGG
ATAGCAAGACCGACTACCAGGGCTTCCAAAGCATGTACACCTTCGTGACTTCCCA
TTTGCCACCCGGCTTCAACGAGTACGACTTCGTGCCCCGAGAGCTTCGACCGGGAC
AAAACCATCGCCCTGATCATGAACAGTAGTGGCAGTACCGGATTGCCCAAGGGC
GTAGCCCTACCGCACCGCACCGCTTGTGTCCGATTCAGTCATGCCCGCGACCCCA
TCTTCGGCAACCAGATCATCCCCGACACCGCTATCCTCAGCGTGGTGCCATTTTAC
CACGGCTTCGGCATGTTTACCACGCTGGGCTACTTGATCTGCGGCTTTCGGGTCGT
GCTCATGTACCGCTTCGAGGAGGAGCTATTCTTGCGCAGCTTGCAAGACTATAAG
ATTCAATCTGCCCTGCTGGTGCCCACTATTTAGCTTCTTCGCTAAGAGCACTCT
CATCGACAAGTACGACCTAAGCAACTTGCACGAGATCGCCAGCGGGCGGGCGCC
GCTCAGCAAGGAGGTAGGTGAGGCCGTGGCCAAACGCTTCCACCTACCAGGCAT
CCGCCAGGGCTACGGCCTGACAGAAACAACCAGCGCCATTCTGATCACCCCCGA
AGGGGACGACAAGCCTGGCGCAGTAGGCAAGGTGGTGCCCTTCTTCGAGGCTAA
GGTGGTGGACTTGGACACCGGTAAGACACTGGGTGTGAACCAGCGCGGCGAGCT
GTGCGTCCGTGGCCCCATGATCATGAGCGGCTACGTTAACAACCCCGAGGCTACA
AACGCTCTCATCGACAAGGACGGCTGGCTGCACAGCGGCGACATCGCCTACTGG
GACGAGGACGAGCACTTCTTCATCGTGGACCGGCTGAAGAGCCTGATCAAATAC
AAGGGCTACCAGGTAGCCCCAGCCGAAGTGGAGAGCATCCTGCTGCAACACCCC
AACATCTTCGACGCCGGGGTCGCCGGCCTGCCCGACGACGATGCCGGCGAGCTGC
CCGCCGAGTCGTCTGTGGAACACGGTAAAACCATGACCGAGAAGGAGATCG
TGGACTATGTGGCCAGCCAGGTTACAACCGCCAAGAAGCTGCGCGGTGGTGTGT
GTTCGTGGACGAGGTGCCTAAAGGACTGACCGGCAAGTTGGACGCCCCGAAGAT
CCGCGAGATTCTCATTAAAGGCCAAGAAGGGCGGCAAGATCGCCGTGTAAATAATTC
TAGAGTCGGGGCGGCCGCGCTTCGAGCAGACATGATAGGATCCAGAGCTCAC
CGCGGACTCGAGTAACATCACATTTAAAAGCATCTCAGGTAAGTATATTTTGAAT
TTTTTAAAAAAGTAACTGTAATAGTTATTATTTAAATAGCAAAGATTGACCATT
CCAAGAGCCATATAGACCAGCACCGACCACTATTCTAAACTATTTATGTATGTAA
ATATTAGCTTTTAAAATTCTCAAAATAGTTGCTGAGTTGGGAACCACTATTATTTT
TATCGATTTCAGCAGCCGTAAGTCTAGGACAGGCTTAAATTGTTTTTCACTGGTGTA
AATTGCAGAAAGATGATCTAAGTAATTTGGCATTATTTTAAATAGGTTTGAAAAA
CACATGCCATTTTACAAATAAGACTTATATTTGTCCTTTTGTTTTTTCAGCCTACCAT
GAGAATAAGAGAAAGAAAATGAAGATCAAAAGCTTATTCATCTGTTTTTCTTTTT

CGTTGGTGTAAAGCCAACACCCTGTCTAAAAAACATAAATTTCTTTAATCATTTTG
CCTCTTTTCTCTGTGCTTCAATTAATAAAAAATGGAAAGAATCTAATAGAGTGGT
ACAGCACTGTTATTTTTCAAAGATGTGTTGCTATCCTGAAAATTCTGTAGGTTCTG
TGGAAGTTCCAGTGTTCTCTCTTATTCCACTTCGGTAGAGGATTTCTAGTTTCTTGT
GGGCTAATTAAATAAATCATTAAATACTCTTCTAAGTTATGGATTATAAACATTCA
AAATAATATTTTGACATTATGATAATTCTGAATAAAAGAACAAAAACCATGGTAT
AGGTAAGGAATATAAAACATGGCTTTTACCTTAGAAAAACAATTCTAAAATTCA
TATGGAATCAAAAAAGAGCCTGCAGGCGGAATTGCCAGCTGGGGCGCCCTCTGG
TAAGGTTGGGAAGCCCTGCAAATGACAAGAGACAGGATGAGGATCGTTTCGCAT
GATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTA
TTCGGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTTCC
GGCTGTCAGCGCAGGGGCGCCCGGTTCTTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGC
CCTGAATGAACTGCAGGACGAGGCAGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGG
CGTTCCTTGCGCAGCTGTGCTCGACGTTGTCACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTG
CTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGATCTCCTGTCATCTCACCTTGCTCCTGCCG
AGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGGCGGCTGCATACGCTTGATCCGGC
TACCTGCCCATTGACCAACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGCACGTACTCGG
ATGGAAGCCGGTCTTGTCGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGCTC
GCGCCAGCCGAAGTGTTCGCCAGGCTCAAGGCGCGCATGCCCGACGGCGAGGAT
CTCGTCGTGACCCATGGCGATGCCTGCTTGCCGAATATCATGGTGGAAAATGGCC
GCTTTTCTGGATTCATCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGA
CATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCGAATGGGCTGAC
CGCTTCCTCGTGCTTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTTCGCAGCGCATCGCCTTCTA
TCGCCTTCTTGACGAGTTCTTCTGAGCGGGACTCTGGTCTAGAGTTCCACTGAGCG
TCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGT
AATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGTTGCCG
GATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGCAGAGCGCAGA
TACCAAATACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCT
GTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAG
TGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAG
GCGCAGCGGTTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGA
ACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACG
CTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACA
GGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCT

GTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGG
GCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTT
TGCTGGCCTTTTGCTCACATGGCTCGACAGATCGCGGCCGCAAGAGATCATTAAAT
TAAGATCTTTTTGATGGCAGAGTTCAGTTTACCGCCTATAAGGCTTATAAATCTAC
AGGGTAATCTTGATTAAGCTTCTCTGAACTGAGTTGCAAAGGAACCTAATGGGAA
GAAAGTAGTGGATGCTGGAAAGAGATCGAGTAGGGATGTGGATAGAGAGGAGCC
TGAGGATGATGTCATAGCCAGGCCAAGAAGTAGCCTCCACTGGACGACTCAGTG
GAGTGCAAGTGAAGGCAAGAACGAGATATCCCTAACATGGAGCAAGCTGTCTGC
CTCGAGGATGCTTGATACGTCAACACAGACCACAAAAGGCAGGGCTTTTCTAAAG
AGATTATAATTATATCTACCTTTTGGGTACAGGAGGTGAATGGAAGGAAGGGATT
CTGGAGCAGATATCCCAAAGAAGAATCCCGAAGCAGAACTCCTCGCACAAGGT
TATCTAAATCTCCTTGACAGGTGCACAGGCAGAGAAGGCATTTGGCCCTTGAAGT
AACATTTACTTGAGAGGTTGGGACAATTCTGTACGCTTAGGACAAGCCAGCTGA
CCCTGAGCCCAGGAGCACCTAGGACTGCAGCACAGAAAATACACCAGCTGGCC
GGTCGCCCCCTCCTTTGTTCCATTCCCGGGGGATTGGAGTAGCGTTGGAGTCACCG
ACGCCATCCCCTCCCGCCTCTGGCGTGCATGGAGCATGCGCTTCCTTCCTCACTTC
CTCTGCAGGAGGGAGCGAGAGTAAAGCTACGCCCTGGCGCGCAGTCTCCGCGTC
ACAGGAACTTCAGCACCCACAGGGCGGACAGCGCTCCCCTCTACCTGGAGACTTG
ACTCCCGCGCGCCCCAACCCTGCTTATCCCTTGACCGTCGAGTGTGAATTCAGCCT
CTGGCAAAGGTACCAGTGTACAGGTTTGTTCCTTTTTTAAAATACATTGAGTATG
CTTGCCTTTTAGATATAGAAATATCTGATGCTGTCTTCTTCACTAAATTTTGATTA
CATGATTTGACAGCAATATTGAAGAGTCTAACAGCCAGCACGCAGGTTGGTAAGT
ACTGTGGGAACATCACAGATTTTGGCTCCATGCCCTAAAGAGAAATTGGCTTTCA
GATTATTTGGATTAAAAACAAAGACTTTCTTAAGAGATGTAAAATTTTCATGATG
TTTTCTTTTTTGCTAAAACTAAAGAATTATTCTTTTACATTTTCAGTTTTTCTG

6.2 Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Mirjam Tamme
(sünnikuupäev: 04.07.1993)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

“ Reportergeeni koespetsiifilise ekspressiooniga plasmidi kondtrueerimine “,
mille juhendajad on PhD Liis Andresen ja PhD Kaido Kurrikoff,

1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil,
sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja
lõppemiseni;

1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas
digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **05.25.2015** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja
lõppemiseni.

2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega
isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 25.05.2015